

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/04520	<b>Applicant's or agent's file reference</b> H1-005PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 23 August 1999 (23.08.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 13 November 1998 (13.11.98)
<b>Applicant</b> SUGIYAMA, Tomoyasu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

31 May 2000 (31.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Kiwa Mpay

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

特許協定条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/29568</p> <p>(43) 国際公開日 2000年5月25日(25.05.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04520</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月23日(23.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/324201 1998年11月13日(13.11.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 杉山友康(SUGIYAMA, Tomoyasu)[JP/JP] 〒130-0003 東京都墨田区横川5-4-3-512 Tokyo, (JP) 太田紀夫(OTA, Toshio)[JP/JP] 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa, (JP) 石井静子(ISHII, Shizuko)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-202 Chiba, (JP) 若松 愛(WAKAMATSU, Ai)[JP/JP] 〒292-0014 千葉県木更津市高柳1473-4-202 Chiba, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア 特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: HYBRIDIZATION PROBE</p> <p>(54)発明の名称 ハイブリダイゼーションプローブ</p> <p>(57) Abstract By using as a spacer nucleotide a nucleotide having an affinity with a base pair bond weaker than that of a/c or g/c, hybridization caused by a base sequence which has been added for labeling can be effectively inhibited.</p>		

## (57)要約

スパーサーヌクレオチドとして、塩基対結合の親和性が a/c 間、あるいは g/c 間よりも弱いヌクレオチドを利用する。標識のために付加した塩基配列に起因するハイブリダイゼーションが効果的に抑制される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EES エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	EES スペイン	LI セリヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レント	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シェラ・レオネ
BB バルバドス	GDE グレナダ	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BF ブルギナ・ファソ	GH ガーナ	MA モロッコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MC モナコ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MG マダガスカル	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	共和国	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NO ノルウェー	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュージーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KGP キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
	朝鮮	RO ルーマニア	

## 明細書

### ハイブリダイゼーションプローブ

#### 技術分野

本発明は、標識 DNA、ならびに標識 DNA による遺伝子の検出方法に関する。

#### 背景技術

標識 DNA は、相補的な塩基配列を持つ DNA 間の特異的な結合に基づく幅広い分析方法に利用されている。DNA を標識するためには、次のような方法が公知である。

- (1) 合成 DNA の 5' 末端に T 4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてラジオアイソトープ標識したリン酸を導入する
- (2) 化学法によりオリゴ DNA の末端にビオチンやジゴキシゲニンなどを直接付加して標識する、または
- (3) 合成したオリゴ DNA に後からターミナルトランスフェラーゼなどを用いて標識ヌクレオチドを付加する

しかしこれらの方法のうち、(1)や(2)では比活性の高いプローブを作製することは困難であった。これらの方法では、末端への結合に基づいているために DNA 1 分子当たり標識分子 1 つしか導入できない。したがって高い比活性は望みにくい。

一方 3' 末端テーリング標識法とも呼ばれる(3)の方法は、複数のヌクレオチドを連結する反応である。多数の標識ヌクレオチドやヌクレオチド誘導体（以下、両者を同時に意味する用語として「ヌクレオチド類」を用いることがある）の導入が可能で、高い比活性を達成できる。この方法では、導入するヌクレオチド誘導体の立体障害が問題となって複数のヌクレオチド誘導体の導入が困難となるこ

とがあるが、立体障害はスパーサーとしてデオキシアデニル酸(dAMP)、デオキシチジル酸(dCMP)、デオキシグアニル酸(dGMP)、チミジル酸(dTMP)、あるいはデオキシウリジル酸(dUMP)ヌクレオチド等の立体障害の無いヌクレオチドを混在させることによって解消される。しかし他方では、導入したヌクレオチド類やスパーサーとしたヌクレオチドのために、反応生成物全体としてはもとの DNA とは異なった塩基配列を持つことになる。その結果として、この付加されたヌクレオチド類の塩基配列に起因するハイブリダイゼーションが生じるという問題点があった。このようなハイブリダイゼーションを生じる塩基配列の一つに cDNA のポリ A テールに代表される 1 種類のみの塩基の連続配列を挙げることができる。標識化のために新たに付加したヌクレオチド類の塩基配列によるハイブリダイゼーションのためにシグナル/ノイズ比(以下 S/N 比と記載する)が低下してしまつては、たとえプローブの比活性が高くとも感度アップにはつながらない。

標識のために付加した塩基配列に起因する、標識すべき DNA に依存しないハイブリダイゼーションを抑制するためには、デオキシアデニル酸(dAMP)、デオキシチジル酸(dCMP)、デオキシグアニル酸(dGMP)、チミジル酸(dTMP)、あるいはデオキシウリジル酸(dUMP)をそれぞれ単一あるいはランダムに重合したポリ核酸をハイブリダイゼーションの際のキャリアーとして用いて、シグナルのバックグラウンドを上昇させる原因となる塩基配列をマスクする必要があった。しかしこのような方法を用いても、標識のために付加した塩基配列に起因するハイブリダイゼーションを完全に取り除くことは困難であった。

さて、現在の array 技術を用いた遺伝子発現プロファイリングでは、固定化した cDNA やオリゴ DNA に対して、検討すべき RNA の cDNA を標識してハイブリダイズ(逆ノーザンブロッティング)させている(Science (1999) 283,83-87; Nat Biotechnol (1996) 14, 1675-80)。通常のノーザンブロッティングと異なり、プローブではなく標的塩基配列を標識するのは、現在の標識方法ではこのような解析方法に必要な感度を達成するのが困難なためである。この方法は一度に大量の

遺伝子の解析ができる点で優れている。しかし異なる array 間のシグナルの比較によって発現の変動を検討するためには、比較に使用する array が全く同じであることが要求される。ところが現実には、複数の array 間で均一性を保証することは容易ではない。そのためもしも 2 つ以上の RNA を異なる array によって比較するのであれば、array の違いを補正する必要がある。そこで、検討すべき RNA が 2 種類の場合は、通常はそれぞれ異なる蛍光でラベルして、1 つの array 上での競争的なハイブリダイゼーションを観察することによって、発現変化を観察している。十分な感度を実現できるプローブが提供されれば、通常のノーザンハイブリダイゼーションと同様の原理、すなわち固定化した標的塩基配列に対して標識プローブを反応させることが可能となる。このような方法が実現すれば、単一の array に基づいて複数の遺伝子の発現状態を解析できるようになり、array 技術の可能性を飛躍的に高めることになるだろう。

ところで、核酸の増幅反応においてイノシン酸を基質として用いることによって、増幅生成物の 2 次構造の形成が妨げられることが知られている。2 次構造の形成は、たとえばゲル電気泳動などにおいては解像度の低下につながるとされており、したがってイノシン酸の利用によって結果的に感度の向上が期待できる。この原理は、DNA 合成である PCR(Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 76, 2232-2235)や、RNA 合成システム(特開平 6-165699 号公報)において利用されている。また 7-デアザ-2'-デオキシグアノシン-5'-トリホスフェート(c7dGTP)を用いて PCR を行くと、やはり複雑な 2 次構造の形成を抑制できることが報告されている(W090/03443)。しかし、これらの報告は、いずれも核酸の増幅生成物における 2 次構造の形成阻害を目的としており、ハイブリダイゼーションアッセイにおける非特異的な塩基対結合の防止について示唆を与えるものではない。また構造的に見ても、これらの方法が標的核酸の塩基配列の一部をイノシンに変換している点において本発明とは異なっている。

### 発明の開示

本発明は、比活性の高いこと、そして高い特異性を維持することができること、という2つの条件を満たす標識 DNA の提供を課題とする。

本発明者らは、3' 末端テーリング標識した DNA のハイブリダイゼーションの特異性を損なっている原因の一つが、標識のために付加したヌクレオチドやヌクレオチド類で構成された塩基配列に由来していることに着目した。その構成塩基が、a、c、t、g、あるいは u であるかぎり、標識のために付加した塩基配列はそれら塩基配列に相補的な塩基配列を持つ核酸に対するハイブリダイゼーションの原因となってしまう。そこで、標識のために付加するヌクレオチドやヌクレオチド類を塩基対結合の親和性が弱いものとするこゝで、特異性の改善が可能となるのではないかと考えた。更に、比活性の高いプローブを与える 3' 末端テーリング標識法を可能とするために、ターミナルトランスフェラーゼの基質となりうるヌクレオチドやヌクレオチド類を選択することによって本発明を完成した。すなわち本発明は、以下の標識 DNA、ならびにこの標識 DNA の製造方法と用途に関する。

- (1) 標識すべき DNA に、標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含む塩基配列を付加したハイブリダイゼーションプローブであつて、この付加された塩基配列が次の特徴 a) および b) を備えたものであるハイブリダイゼーションプローブ。
  - a) 標的塩基配列を構成する塩基との塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間および g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体を含む
  - b) ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入することができる
- (2) a) のヌクレオチドが、イノシン酸である (1) に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
- (3) 付加される塩基配列が、標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体と、

標識されていないイノシン酸またはその誘導体で構成されている (2) に記載のハイブリダイゼーションプローブ。

- (4) 標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体が、標識されたイノシン酸またはイノシン酸誘導体である (3) に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
- (5) 標識すべき DNA のためのストリンジेंटなハイブリダイゼーションの条件下で、標識のために付加される塩基配列がこの配列単独ではいかなる塩基配列ともハイブリダイゼーションすることができないものである (1) に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
- (6) 請求項 1-5 のいずれかのハイブリダイゼーションプローブを用いる、標識すべき DNA と相補的な塩基配列を持つ核酸の検出方法。
- (7) 検出対象が RNA または cDNA ライブラリーである (6) に記載の検出方法。
- (8) ターミナルトランスフェラーゼによる DNA の 3' 末端テーリング標識法において、塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間、および g/c 間の水素結合よりも弱く、かつターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチドの付加反応の基質となりうるヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体を基質として用いる DNA の標識法。
- (9) ヌクレオチドがデオキシデオキシイノシン 5' 3'リン酸である (8) に記載の DNA の標識法。
- (10) 塩基対結合が弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体と標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とを混合し基質とする (8) に記載の DNA の標識法。
- (11) 以下の要素を含むハイブリダイゼーションプローブの合成用キット。
  - i) 次の特徴 a) および b) を備えたヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体
    - a) 標的塩基配列を構成する塩基との塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u



間および g/c 間の水素結合よりも弱い

b) ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入しうる

ii) 標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導體

iii) ターミナルトランスフェラーゼ

(12) DNA に標識ヌクレオチドを含む塩基配列を付加したハイブリダイゼーションプローブの標識すべき DNA の配列に基づかないハイブリダイゼーションを防止する方法であって、付加する塩基配列に塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間、および g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導體を挿入する方法。

本発明の標識すべき DNA とは、ハイブリダイゼーションによって標的塩基配列と特異的に結合する DNA である。一般的にはプローブと呼ばれる。この DNA は、通常は標的塩基配列に相補的な塩基配列で構成される。あるいはある程度の変異があってもハイブリダイゼーションが可能なように、設計することもできる。そしてストリンジントな条件下で標的塩基配列に対してハイブリダイゼーションが可能で、しかも通常の条件で洗浄しても溶出することのない安定な 2 本鎖を維持しうる鎖長を持つ。本発明においては、この標識すべき DNA については、通常用いられていたものをそのまま応用することができる。すなわち、検出の目的に応じて、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドであったり、あるいはプラスミドや染色体等を切断することによって得ることができる DNA の断片であっても良い。また、核酸の酵素的な合成法によって得られる PCR 生成物や cDNA、あるいはそれらの断片であることもできる。一方、標的塩基配列としては、DNA、RNA、あるいは DNA-RNA ハイブリッド等、塩基対結合が可能なものであれば特に限定されない。標的塩基配列と、プローブとのハイブリダイゼーションの特異性と強さは、塩基対結合を構成する塩基の種類と反応条件とによって決定される。ハイブリダ

イゼーションに影響を与える因子と、一般的な条件を以下にまとめた(Molecular Cloning, Cold spring harbor laboratory press, 1989)。

反応溶液の温度                      6 8 °C

塩濃度                                  6 × S S C

( 2 0 × S S C : 3 M NaCl、 0 . 3 M クエン酸ナトリウム )

pH                                        7 . 0

ドデシル硫酸ナトリウム    0 . 5 %

5 × Denhardt's reagent

( 5 0 × Denhardt's reagent の組成 :

0.01g/mL Ficoll type 400; Pharmacia 製

0.01g/mL ポリビニルピロリドン

0.01g/mL ウシ血清アルブミン ファクターV; Shigma 製)

本発明においては、標識すべき DNA に対して標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含む塩基配列を付加することによってハイブリダイゼーションプロブを構成する。付加される塩基配列は標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含むとともに、次の特徴 a) および b) を備える。

a) 標的塩基配列を構成する塩基との塩基対結合の親和性が、a/t 間、a/u 間、そして g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドおよび/またはヌクレオチド誘導体を含む

b) ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入することができる

塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間、および g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドとは、そのヌクレオチドが atgc および u といった塩基のすべてに対して、一般的な相補的塩基である tacg および a との間の親和力よりも弱い親和性を

持っていることを意味する。あるいは、標的塩基配列を構成している塩基のいずれに対しても、それらが通常相補的な塩基対結合を行うべきパートナーに比べて弱い親和性しか持ちえないと表現することもできる。更にヌクレオチドの誘導体とは、ヌクレオチドに対して官能基を導入することによって得ることができる化合物を意味する。あるいは天然のヌクレオチドの構造を模倣して化学的に合成されたヌクレオチドや、更には天然のヌクレオチドの構造を化学修飾することによって塩基対結合を弱めたヌクレオチドも、先に述べた条件 a) および b) を満たすものであれば本発明における塩基対結合の弱いヌクレオチド誘導体に含まれる。

更に本発明においては、このヌクレオチド、ヌクレオチド誘導体、そしてヌクレオチド類が、ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入しうるものであることを特徴とする。これは、3' 末端テーリング標識法に利用するために必要な条件である。前記条件を満たすヌクレオチドとして、イノシン酸やキサンチル酸を示すことができる。中でもイノシン酸は、入手の容易なヌクレオチドであり、機能的に見ても本発明による効果を確実に達成することができる望ましいヌクレオチドである。たとえばデオキシイノシン 5' 3' リン酸を基質としてターミナルトランスフェラーゼを作用させれば、DNA の 3' 末端にデオキシイノシン酸を含む塩基配列を付加することができる。

一般的に、イノシン酸は塩基の種類を問わずある程度の強さで塩基対結合を形成するものと考えられていた。したがって、本発明のように標識のための配列に挿入することは、かえって非特異反応を大きくする心配があった。ところが実際には、付加すべき配列にイノシン酸を挿入すると、非特異反応を大幅に抑制することが可能となる。

本発明に基づくハイブリダイゼーションプローブ、あるいはその製造方法においては、前記塩基対結合の弱いヌクレオチドを含むことを必須として、その他のヌクレオチド（たとえば atcg および u、あるいはその誘導体）の存在を許容することができる。これらのヌクレオチドは、標識されたものであっても良い。ただ

し、前記塩基対結合の弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体以外のヌクレオチドを構成塩基として含む場合には、標識のために付加した部分がハイブリダイゼーションを起こさないような条件としなければならない。望ましい条件は、標識すべき DNA のストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、付加される塩基配列がその配列単独ではいかなる塩基配列ともハイブリダイゼーションすることができないものである。

このような条件を達成するためには、標識のために付加する配列に占める前記塩基対結合の弱いヌクレオチド（あるいはヌクレオチド誘導体）の割合を大きくする。最低限必要となる割合は、その種類と混在するヌクレオチドの構成や全体の長さの影響を受けるので一般的な範囲を示すことはできないが、当業者は本発明の開示に基づいて経験的に設定することができる。なお、標識すべき DNA に付加されるヌクレオチド、あるいはヌクレオチド誘導体は、いずれも標識の対象とすることができる。したがって、標識イノシン酸に対して、非標識ヌクレオチドを組み合わせることも可能である。この場合には非標識ヌクレオチドのみでスペーサーを構成してもよいし、あるいはスペーサーとしての非標識イノシン酸を混在させることもできる。たとえばデオキシイノシン 5' 3' リン酸（親和性の弱いヌクレオチド）とジゴキシゲニン標識化デオキシウラシル 5' 3' リン酸でテーリング標識する場合には、後者の割合を 1 / 10 以下とすることにより本発明の条件を満たすことができる。

3' 末端テーリング標識法に用いるターミナルトランスフェラーゼは、塩基の種類を識別することなく、DNA の 3' 末端にヌクレオチドをランダムに付加する。したがって、付加される塩基配列に占める構成塩基の割合は、基質として添加するヌクレオチドとヌクレオチドの濃度比によって調整する。その割合を具体的に示せば、たとえばデオキシイノシン 5' 3' リン酸をジゴキシゲニン標識化デオキシウラシル 5' 3' リン酸標識と混合して用いる場合、前者の濃度を 2 ~ 10 倍過剰としておくことによって、標識の比活性向上と確実な非特異反応の抑制効果を期待

できる。一般に、標識を付したヌクレオチドやその誘導体はターミナルトランスフェラーゼによる付加反応の基質となりになる傾向があるので、標識の種類と、組み合わせるべきヌクレオチドに合わせて、適切な濃度比を経験的に設定するようにする。濃度比のみで各ヌクレオチドの配列を厳密に制御することは不可能であるが、確率的にハイブリダイゼーションを起こしうるヌクレオチドの連続が生じない条件を本明細書の開示に基づいて経験的に設定することは当業者にとって自明である。

ところで、塩基対結合の弱いヌクレオチドの構成比率を高めるという点では、たとえばデオキシイノシン酸のみで構成された標識用の配列が望ましい。このような態様は、標識ヌクレオチドとして、標識化したデオキシイノシン酸を組み合わせることによって実現することができる。構成塩基がデオキシイノシン酸のみの場合には、標識化デオキシイノシン 5' 3 リン酸と非標識化デオキシイノシン 5' 3 リン酸との濃度比によって、最も比活性の高い標識プローブを与える条件に基づいて 3' 末端テーリング標識を行えば良い。

3' 末端テーリング標識法は公知(Molecular Cloning, Cold spring harbor laboratory press, 1989)である。すなわち、標識すべき DNA (あるいはオリゴヌクレオチド) に対して、標識ヌクレオチドとスパーサー (標識していないヌクレオチド) を基質として加え、ターミナルトランスフェラーゼを作用させる。このとき本発明においては、スパーサーとしてデオキシイノシン 5' 3 リン酸のようなヌクレオチドを加えればよい。ターミナルトランスフェラーゼには、一般に仔ウシ胸腺由来の酵素が使用されるが、由来は特に限定されない。また反応液には、反応環境を至適 pH に保つ緩衝剤、ウシ血清アルブミン等の酵素の保護剤、あるいは酵素活性の発現に必要な金属イオンを供給するために適宜塩化コバルト等の塩類を添加しておく。1-10units のターミナルトランスフェラーゼを作用させ、37°C で 15 分間程度反応させれば、標識のための塩基配列の付加が達成される。

バッチ間の比活性の変動を小さくするには、反応条件を統一するのが望ましい。

そのためには、反応時間の制御を目的として反応停止剤を利用することができる。たとえば、グリコーゲンとエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)を添加することにより、ターミナルトランスフェラーゼの酵素活性は急速に失われ反応が停止する。

本発明において、ヌクレオチド（あるいはヌクレオチド誘導体）とともに標識用の塩基配列を構成する標識ヌクレオチドあるいはヌクレオチド誘導体は、任意のヌクレオチドであって良い。標識用の塩基配列の中に散在する標識用のヌクレオチドは、たとえ通常の塩基対結合が可能な塩基であっても、分散して配置されるためハイブリダイゼーションすることは困難である。したがって、atcg、あるいはuといった一般的なヌクレオチドを組み合わせても良いし、あるいは前記のように標識ヌクレオチドまでもイノシン酸のような塩基対結合の親和性の弱いヌクレオチドとすることもできる。標識用の塩基配列を構成する標識ヌクレオチドとしては、放射性同位体  $^{32}\text{P}$  で置換したヌクレオチドを例示することができる。標識用のヌクレオチド誘導体としては、ヌクレオチドの官能基に蛍光化合物や結合性リガンドを導入したヌクレオチドを例示することができる。ヌクレオチドを誘導化する化合物を具体的に示せば、次のようなものを例示することができる。

蛍光化合物：フルオレセイン、ローダミン、アミノメチルクーマリン

結合性リガンド：ジゴキシゲニン、ビオチン

ここに述べた本発明に基づく 3' 末端テーリング標識法を実施するために必要な要素を予め組み合わせてハイブリダイゼーション用プローブの合成用キットとすることができる。本発明によるキットには、ヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体、ヌクレオチド類、ターミナルトランスフェラーゼを必須として、更に反応に好適な緩衝液、反応停止剤、反応後の DNA の回収を行うための試薬などを組み合わせることができる。

本発明に基づくハイブリダイゼーションプローブは、各種の核酸検出に利用することができる。すなわち、cDNA のスクリーニング、病原微生物やウイルスの遺伝子検出、あるいはがん遺伝子の変異の分析といった、幅広い用途に利用するこ

とができる。また本発明によるハイブリダイゼーションプローブは、様々なアッセイフォーマットに適用することができる。すなわち、フィルターに固定した標的 DNA との反応を観察するドットハイブリダイゼーションアッセイ、固定組織中で核酸の局在を観察するためのインサイチュ・ハイブリダイゼーションアッセイ等、公知のアッセイフォーマットへの適用が可能である。3' 末端テーリング標識法によって得ることができるハイブリダイゼーションプローブを用いたアッセイ法は公知(Molecular Cloning, Cold spring harbor laboratory press, 1989)である。ただし標識のために付加した塩基配列に起因するハイブリダイゼーションが著しく減じているため、ポリ核酸によるマスク処理は不要である。またハイブリダイゼーションの対象も DNA には限定されず、RNA を対象とすることもできる。あるいは、コロニーやプラークのスクリーニングに使用することもできる。

以下に本発明によるハイブリダイゼーションプローブの感度と特異性に基づく応用例の一つとして、array 技術を利用した遺伝子発現プロファイリングについて述べる。本発明による高感度・高特異的なハイブリダイゼーションプローブを用いれば、多種類の RNA に対して、array の補正をすることなく、正確な発現プロファイリングが可能となる。あるいは本発明のハイブリダイゼーションプローブは、single nucleotide polymorphisms (SNPs)の検出にも利用することができる。

すなわち、発現を検討すべき RNA、またはその cDNA を標識しないまま 1 つの支持体に混合物の状態で array する。サンプルとしては種々の組織由来 cDNA や、薬物投与後の経時的な細胞の cDNA を用いることができる。この array に、検討すべき遺伝子に特異的な本発明によるプローブ (第 1 のプローブ) を、過剰量ハイブリダイゼーションさせて、そのプローブでのシグナルを検出し、発現状態を解析する。次にそのプローブの  $T_m$  値に基づいて 2 本鎖を変性条件に曝し、プローブを array 上に固定されている標的塩基配列から遊離させる。変性条件は温度コントロールであっても良いし、電気的なコントロールによってハイブリダイゼーショ

ンを制御する技術も公知である (Nat Biotechnol (1999) 17, 365-370)。続いて次の遺伝子のためのプローブ (第2のプローブ) に代えて、同様に発現状態を解析する。一連の操作を検討が必要な遺伝子の数だけ繰り返し行う。この方法では、単一の array を繰り返し用いていることから、大量遺伝子の発現プロファイルも精度良く解析することができる。一連の操作は容易に自動化することができるので、本発明のハイブリダイゼーションプローブは遺伝子発現プロファイリングの飛躍的な効率化を実現することが理解できる。もちろん、本発明のハイブリダイゼーションプローブが SNP の解析においても同様の効率化をもたらすことは言うまでも無い。

ここに述べた利用方法の原理は、いわゆる cDNA あるいは RNA のドットブロットアッセイである。しかし高感度 高特異的なオリゴ DNA をプローブとして用いること、および多種類のプローブのハイブリダイゼーションを、同じ array を用いてシーケンシャルに行う点が大きな特徴である。cDNA や RNA を固定した array の代えて、組織切片を試料として (Nature Med. (1998) 4, 844-847) この特徴を生かした解析方法を実施することもできる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明によってデオキシイノシン酸をスペーサーとして用いて3' テーリング標識したオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションアッセイの結果を示す写真である。図中、dIMP はデオキシイノシン酸を、dAMP はデオキシアデニル酸を示す。

図2は、本発明によってデオキシイノシン酸をスペーサーとして用いて3' テーリング標識したオリゴヌクレオチドをプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。図中、1つのバンドはプローブが特異的に標的 mRNA を検出したことを示す。



### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。

#### [実施例 1] オリゴヌクレオチドの標識化

(1) National center for biotechnology information (National institutes of health, USA) が運営管理する GenBank シーケンスデータベースに登録されている、アクセスコード X75861 の遺伝子に対する特異的オリゴヌクレオチド (cctacaaagaaaaatggagagcct; 配列番号: 1) を合成法によって作製し (GIBCO 社が作製)、その 100pmol を用いて、ターミナルトランスフェラーゼによるオリゴヌクレオチド 3' 末端の標識化を行った。標識には 0.5mM デオキシイノシン 5' 3 リン酸 (親和性の弱いヌクレオチド) と 0.05mM ジゴキシゲニン標識化デオキシウラシル 5' 3 リン酸 (標識ヌクレオチド) を含む反応液 (0.2M カコジル酸カリウム、25mM トリスヒドロキシアミノメタン、0.25mg/ml ウシ血清アルブミン、5mM 塩化コバルト、pH6.6) 中で、あるいは比較対照のために 0.5mM デオキシアデニン 5' 3 リン酸と 0.05mM 標識化デオキシウラシル 5' 3 リン酸を含む反応液中で、2.5 units/ $\mu$ L のターミナルトランスフェラーゼを作用させ、37°C で 15 分間インキュベートした。

(2) 氷上に移し、停止溶液 (終濃度 10  $\mu$ g/ml グリコーゲン、0.2mM エチレンジアミンテトラ酢酸) を添加した。さらに塩化リチウムを終濃度 0.4mM と 3 倍容量のエタノールを添加して、-30°C で 2 時間おいた。

(3) 12,000g で遠心し、DNA を沈殿させ、沈殿した DNA を 70% エタノールで洗浄後、乾燥させた。乾燥した標識化 DNA を 100  $\mu$ L の水に溶かした。

#### [実施例 2] 標的遺伝子の固定化

プラスミド DNA のナイロン膜への固定化は以下のように行った。約 0.1ng/ $\mu$ L の標的 DNA を 96°C で、10 分加熱した。これを急速氷冷し、核酸プロット用のナイロン膜 (ベーリンガー社製) に 1  $\mu$ L/ドットの量をスポッティングした。2xSSC

(0.3M 塩化ナトリウム、0.03M クエン酸ナトリウム、pH7) で湿らせて、次に UV Crosslinker (Stratagene 社) を用い、その付属のプロトコルにしたがって紫外線を照射してナイロン膜に標的遺伝子を固定化した。標的 DNA としては、前記アクセスコード X75861 の他、この DNA とは無関係な塩基配列で構成される 8 種類の cDNA を用意した。これらの cDNA はすべて 3' 末端にポリ A テールを持っている。

### 〔実施例 3〕 標識化オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは以下のように行った。はじめにナイロン膜のプレハイブリダイゼーションを行った。0.1mg/ml のポリ A を添加した、または添加しないハイブリダイゼーション溶液 (6xSSC、1%(w/v) ブロッキング溶液 (ベーリンガー社製)、0.1%(w/v) Nラウロイルサルコシン、0.02%(w/v) ドデシル硫酸ナトリウム) 中で、ナイロン膜を 68°C で 3 時間インキュベートした。

次にナイロン膜と標識化オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション液中に 5pmol/ml の標識化オリゴ DNA を添加し、60°C で 12 時間インキュベーションした。ナイロン膜は洗浄液 (6xSSC、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム) 中に浸して、60°C で 15 分を 4 回洗浄した。

ハイブリダイゼーションした標識化オリゴヌクレオチドの検出は、発光検出法を用いた。ベーリンガー社製の発光検出キットを用いて、その使用方法書に従って行った。簡単に説明すると、アルカリホスファターゼ標識した抗標識化ジゴキシゲニン抗体でナイロン膜上の標識化オリゴ DNA を結合し、アルカリホスファターゼの発光基質を添加して発光させた。発光の検出は X 線フィルムに感光させて行った。

結果を図 1 に示した。デオキシイノシン 5' 3' リン酸をスパーサーとして用いて 3' テーリング標識したオリゴヌクレオチドは、その同じ DNA 塩基配列を持つ cDNA をインサートとして持つプラスミドに特異的にハイブリダイゼーションし、関係のない DNA 塩基配列の cDNA にはハイブリダイゼーションしない。対照的に、デオキシアデニン 5' 3' リン酸をスパーサーとして用いて 3' テーリング標識したオリ

ゴヌクレオチドは、その DNA 塩基配列と関係のない cDNA をインサートとして持つプラスミドにも標識すべき DNA の配列に基づかない非特異的なハイブリダイゼーションをしている。この非特異的なハイブリダイゼーションは、あらかじめポリ A オリゴヌクレオチドでプラスミドをマスクしても抑制されていない。

〔実施例 4〕 イノシン酸を用いてテーリング標識したオリゴ DNA をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション

RNA は次のように調製した。すなわち、動物培養細胞株 NT2 (Stratagene 社より購入し、細胞培養は添付マニュアルに従った) に RNA 抽出緩衝液 (0.14 M NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM TrisCl (pH 8.6)、0.5% Nonidet P-40、10 mM vanadyl-ribonucleoside complex) を添加し氷上で 10 分間静置後、10,000 x g、4 度、15 分間遠心して上層を抽出した。更に等量のプロテイナーゼ切断緩衝液 (0.2 M TrisCl (pH 7.8)、25 mM EDTA (pH 8.0)、0.3 M NaCl、2% SDS) を添加して細胞溶液にした。プロテイナーゼ K を終濃度 400  $\mu$ l/ml で添加して、37 度で 90 分間インキュベートした。フェノール・クロロフォルム溶液を添加して水相を抽出した。更にもう一度フェノール・クロロフォルム溶液を添加して水相を抽出し、これに 2.5 倍容量のエタノールを添加した。5000 x g、4°C、10 分間遠心して形成した沈殿物を 70% エタノールで洗浄後、風乾して total RNA とした。total RNA を H<sub>2</sub>O に溶解し、65°C、5 分間インキュベートし、2x column loading 緩衝液 (1x column loading 緩衝液 : 20 mM TrisCl (pH 7.6)、0.5 M NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.1% sodium lauroyl sarcosinate) を等容量添加した。これを column loading 緩衝液で膨潤しているオリゴ dT セルロース (Collaborative Biomedical Products 社製) のカラムに添加して溶出液を取得した。溶出液は再度カラムに添加し、この操作を 3 回繰り返した。5 倍容量の 1x column loading 緩衝液でカラムを洗浄後、2 倍容量の column elution 緩衝液 (10 mM TrisCl (pH 7.6)、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.05% SDS) を添加して、溶出液を回収した。0.1 倍容量の 3M sodium acetate、および 2.5 倍容量のエタノールを添加した。12,000 x g、4°C、10 分間遠心して

形成した沈殿物を 70%エタノールで洗浄後、風乾して mRNA とした。mRNA の電気泳動は以下のように行った。すなわち、mRNA を電気泳動用サンプル液 (4  $\mu$ l formamid、2  $\mu$ l formaldehyde、1  $\mu$ l 10x MOPS、1  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) (10x MOPS: 14.9 g/l MOPS、6.8 g/l sodium acetate、3.7 g/l EDTA、pH7.0) に溶解して、65°Cで 10 分間加熱し、直ちに氷冷した。この RNA をアガロースゲル (1 g agarose、10x MOPS、73.3 ml H<sub>2</sub>O、16.7 ml formaldehyde) をもちいて電気泳動した。アガロースゲルからナイロンフィルター (ベーリンガー社) への RNA のブロッティングは、定法に従った (Molecular Cloning. A laboratory manual/2nd edition (1989) p7.46-7.50、Cold Spring Harbor Laboratory Press)。次にこのナイロン膜に紫外線を照射して RNA を固定化した。

EF1 $\alpha$ に対する特異的オリゴデオキシヌクレオチド (gtcacagaattttgagaccca ; 配列番号 : 2) は GIBCO 社製を用いた。ターミナルトランスフェラーゼによるそのオリゴヌクレオチドの標識化は、前述の方法と同様にして行った。EF1 $\alpha$ の RNA を固定化したフィルターと標識オリゴデオキシヌクレオチドのハイブリダイゼーション、および化学発光法によるハイブリダイゼーションの検出も、前述と同様な方法で行った。結果を図 2 に示した。予想されるサイズ(1.0kb)に単一のバンドが検出されている。図 2 から明らかなように、本発明によるハイブリダイゼーションプローブは、ブロッティングした mRNA の検出に必要な十分な感度と特異性を持っている。したがって、この原理に基づいて遺伝子発現プロファイリングや SNP の検出が可能であることを裏付けている。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、標識のために付加した塩基配列に起因するハイブリダイゼーションが効果的に抑制される。また本発明において利用されるヌクレオチドは、ターミナルトランスフェラーゼの基質となるため、3' 末端テーリング標識法のための基質として添加するだけで、容易に標識を結合させることができる。

本発明で利用される塩基対結合親和性の弱いヌクレオチド（あるいはヌクレオチド誘導体）は、標識用のヌクレオチドそのものとして、あるいはスペーサーとして機能するために、効率的な標識ヌクレオチドの導入をもたらし、高力価な標識オリゴヌクレオチドを与える。このように、本発明によれば、非特異反応の抑制と、高力価な標識オリゴヌクレオチドの提供という2つの課題をともに達成することができる。言いかえれば、本発明に基づいてハイブリダイゼーションにおける S/N 比の向上が容易に実現できるのである。

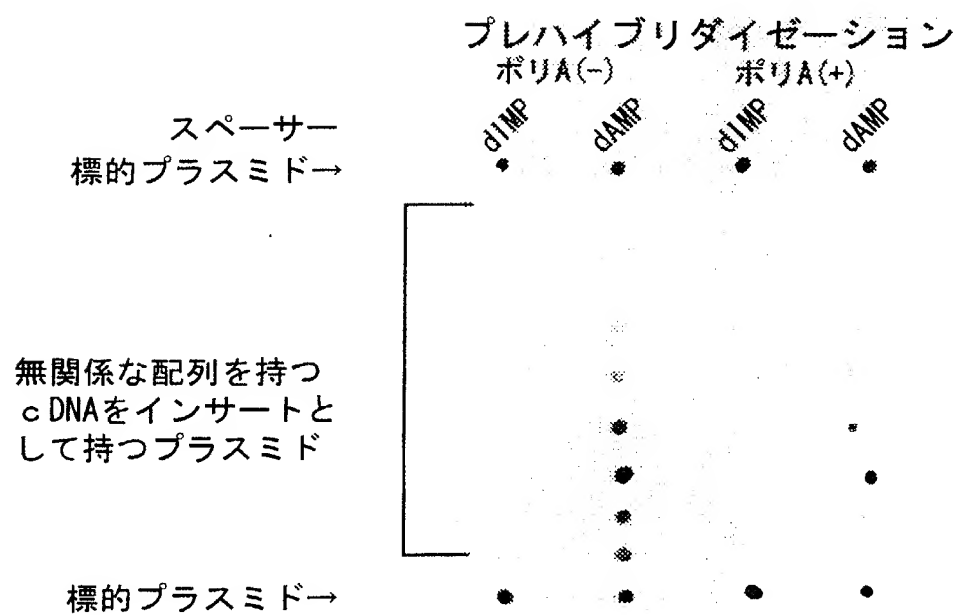
## 請求の範囲

1. 標識すべき DNA に、標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体を含む塩基配列を付加したハイブリダイゼーションプローブであって、この付加された塩基配列が次の特徴 a) および b) を備えたものであるハイブリダイゼーションプローブ。
  - a) 標的塩基配列を構成する塩基との塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間および g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体を含む
  - b) ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入することができる
2. a) のヌクレオチドが、イノシン酸である請求項 1 に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
3. 付加される塩基配列が、標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体と、標識されていないイノシン酸またはその誘導体で構成されている請求項 2 に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
4. 標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体が、標識されたイノシン酸またはイノシン酸誘導体である請求項 3 に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
5. 標識すべき DNA のためのストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で、標識のために付加される塩基配列がこの配列単独ではいかなる塩基配列ともハイブリダイゼーションすることができないものである請求項 1 に記載のハイブリダイゼーションプローブ。
6. 請求項 1 - 5 のいずれかのハイブリダイゼーションプローブを用いる、標識すべき DNA と相補的な塩基配列を持つ核酸の検出方法。
7. 検出対象が RNA または cDNA ライブラリーである請求項 6 に記載の検出方法。

8. ターミナルトランスフェラーゼによる DNA の 3' 末端テーリング標識法において、塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間、および g/c 間の水素結合よりも弱く、かつターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチドの付加反応の基質となりうるヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体を基質として用いる DNA の標識法。
9. ヌクレオチドがデオキシデオキシイノシン 5' 3 リン酸である請求項 8 に記載の DNA の標識法。
10. 塩基対結合が弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体と標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体とを混合し基質とする請求項 8 に記載の DNA の標識法。
11. 以下の要素を含むハイブリダイゼーションプローブの合成用キット。
  - i) 次の特徴 a) および b) を備えたヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体
    - a) 標的塩基配列を構成する塩基との塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間および g/c 間の水素結合よりも弱い
    - b) ターミナルトランスフェラーゼによるヌクレオチド付加反応によって標識すべき DNA に導入しうる
  - ii) 標識ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体
  - iii) ターミナルトランスフェラーゼ
12. DNA に標識ヌクレオチドを含む塩基配列を付加したハイブリダイゼーションプローブの標識すべき DNA の配列に基づかないハイブリダイゼーションを防止する方法であって、付加する塩基配列に塩基対結合の親和性が a/t 間、a/u 間、および g/c 間の水素結合よりも弱いヌクレオチドおよび／またはヌクレオチド誘導体を挿入する方法。

1 / 2

図 1

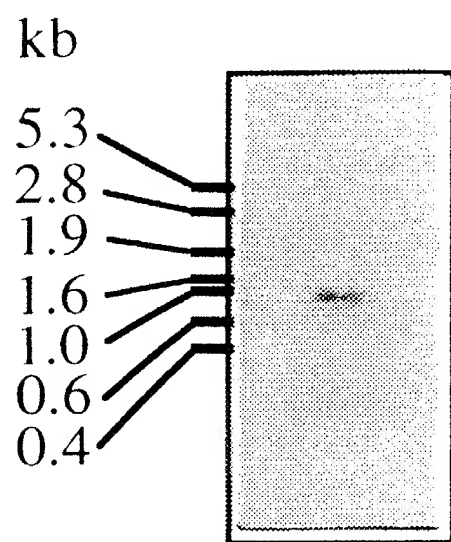






2 / 2

図 2





1/2

配列表  
SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute  
株式会社ヘリックス研究所

<120> Hybridization Probe  
ハイブリダイゼーションプローブ

<130> H1-005PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-324201

<151> 1998-11-13

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

<400> 1

ccctacaaag aaaatggaga gcct

24

<210> 2

<211> 21



2/2

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Probe Sequence

<400> 2

gtcacagaat ttgagaccc a

21



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN) , CA (STN) , MEDLINE (STN) , WPI (DIALOG) , BIOSIS (DIALOG) , JICST (JOIS)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 8-070900, A (Mitsubishi Chemical Corporation), 19 March, 1996 (19.03.96) & EP, 668361, A1 & US, 5738993, A	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" "X" "Y" "&" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 November, 1999 (19.11.99)		Date of mailing of the international search report 30 November, 1999 (30.11.99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-070900, A (三菱化学株式会社) 19. 3月. 1996 (19. 03. 96) & EP, 668361, A1 & US, 5738993, A	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H1-005PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04520	International filing date (day/month/year) 23 August 1999 (23.08.99)	Priority date (day/month/year) 13 November 1998 (13.11.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/11, C12Q 1/68		
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 31 May 2000 (31.05.00)	Date of completion of this report 28 June 2000 (28.06.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04520

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04520

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

The inventions described in claims 1 through 12 are not described in any of the documents cited in the ISR nor in any of the documents considered relevant to the inventions, nor are they obvious to a party skilled in the art.

16T

## 特 許 協 力 条 約

REC'D 13 JUL 2000

WIPO

PCT

PCT

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-005PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04520	国際出願日 (日.月.年) 23.08.99	優先日 (日.月.年) 13.11.98
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68		
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 31.05.00	国際予備審査報告を作成した日 28.06.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9281

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

進歩性 (IS)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲

1-12

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-12に記載されている発明は、いずれも国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、当業者にとって自明なものでもない。



E B



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 H1-005PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04520	国際出願日 (日.月.年) 23.08.99	優先日 (日.月.年) 13.11.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N 15/11, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 8-070900, A (三菱化学株式会社) 19. 3月. 1996 (19. 03. 96) & EP, 668361, A1 & US, 5738993, A	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-70900

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/09

識別記号

Z N A A 9453-4B

9281-4B

庁内整理番号

F I

C 1 2 N 15/ 00

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平7-24410

(22) 出願日 平成7年(1995)2月13日

(31) 優先権主張番号 特願平6-24168

(32) 優先日 平6(1994)2月22日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平6-147291

(32) 優先日 平6(1994)6月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 谷野 信剛

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 久留主 泰朗

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 寺沢 真人

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド及び核酸の塩基配列解析法

(57) 【要約】

【構成】 特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、通常の核酸を構成する塩基のそれぞれと塩基対を形成することができる他の塩基を有する少なくとも一つのヌクレオチドまたはそのオリゴマーからなる、オリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション用プローブとして用いる。

【効果】 本発明によれば、ハイブリダイゼーション感度を上昇させることが可能となるとともに、完全に相補的なハイブリッドとミスマッチを有するハイブリッド、特に末端ミスマッチが区別し易くなり、それによってハイブリダイゼーション法によるDNA塩基配列解析が容易になる。

.....AGCTAGCT<sup>A</sup>CGAGTCATGACGTACTA.....  
.....AGCTAGCT<sup>G</sup>CGAGTCATGACGTACTA.....

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、

特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、

非特異的領域は、通常の核酸を構成する塩基のそれぞれと塩基対を形成することができる他の塩基を有する少なくとも一つのヌクレオチドまたはそのオリゴマーからなる、オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 前記他の塩基と通常の核酸を構成する塩基との結合力が、特異的対合を形成する塩基対の結合力よりも弱いことを特徴とする請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項3】 前記他の塩基がヒポキサンチンである請求項2記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 オリゴヌクレオチドがオリゴデオキシリボヌクレオチドである請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項5】 前記非特異的領域が、特異的領域の5'末端に連結している請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項6】 前記非特異的領域が、特異的領域の5'末端及び3'末端のそれぞれに連結している請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 特異的領域の長さが6～50塩基であり、非特異的領域の長さが2～20塩基である請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 特異的領域の長さが非特異的領域の長さと同じか又はそれ以上である請求項7記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項9】 不溶性担体に固定化された請求項1～8のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項10】 5'末端側の領域で不溶性担体に固定化された請求項9記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項11】 請求項1～10のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、

そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む、核酸の塩基配列解析法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オリゴヌクレオチド及び核酸の塩基配列解析法に関し、詳しくは、核酸の塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノムマッピング等の核酸の塩基配列解析に使用することができるハイブリ

ダイゼーション用プローブに好適に利用できる新規な構造を有するオリゴヌクレオチド、及びそれを用いた塩基配列解析法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】ハイブリダイゼーションによる核酸の塩基配列解析は、例えば塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノムマッピング等において広く行われている。

また、SBH (sequencing by hybridization) [R. Drmanac, et al., Science, 260, 1649 (1993)]、すなわちハイブリッド形成による塩基配列決定法は、高速かつ低コストな方法として実用化が期待されている。

【0003】これらの塩基配列解析においては、ハイブリダイゼーション (ハイブリッド形成) によって生じたプローブと標的配列とのハイブリッドの中で、ミスマッチが存在するものと、ミスマッチがなく完全に相補的なものとを区別する技術が必要である。

【0004】ハイブリダイゼーション反応は、反応溶液のイオン強度、プローブ及びサンプルDNAの塩基構成、反応温度・時間等多くの要因によって支配される複雑な反応であるが、短鎖長のオリゴヌクレオチドをプローブとする場合には、ミスマッチを有するハイブリッドは完全に相補的なハイブリッドと比較して不安定なことから、これらの諸条件を適当に設定することによって、完全に相補的なハイブリッドのみが検出できるような系を構築することが理論的に可能であると考えられている。

【0005】しかしながら、従来、高感度のハイブリダイゼーションを得るためにDNAの塩基を化学修飾する手法 [Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 90, 11460 (1993)] やミスマッチの判別能を高めるためのハイブリダイゼーション条件としてハイブリダイゼーション後の洗浄を低温で長時間行う方法 [DNA and Cell Biology, 9, 527 (1990)] が提案されているが、十分な結果が得られていない。

【0006】特に、プローブの末端付近にミスマッチが存在する場合のハイブリダイゼーションと、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとを正確かつ高感度に区別することは困難であり、これが塩基配列解析の実用化の障壁となっている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ハイブリダイゼーション法による核酸の塩基配列解析の精度を高めるために、高感度のハイブリダイゼーション結果が得られるとともに、末端にミスマッチを有するハイブリッドを完全に相補的なハイブリッドと明確に区別し得るオリゴヌクレオチド及び塩基配列解析法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、核酸の標的配列にハイブリダイズするべく特定の塩基配列を有する領域の末端に、或る種のヌクレオチドからなる領域が結合されたオリゴヌクレオチドを用いれば、高感度のハイブリダイゼーション結果が得られるとともに塩基対のミスマッチが高感度で検出可能なことを見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明は、特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、通常の核酸を構成する塩基のそれぞれと塩基対を形成することができる他の塩基を有する少なくとも一つのヌクレオチドまたはそのオリゴマーからなる、オリゴヌクレオチドである。

【0010】また本発明の方法は、上記オリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む、核酸の塩基配列解析法である。

【0011】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本明細書においていくつかの術語を用いるが、ここで用いるときそれらの術語は次の意味を有する。

【0012】「試料核酸」とは、塩基配列の解析を目的として本発明のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる核酸を意味し、DNAであってもRNAであってもよい。「特異的領域」とは、ハイブリダイズしうる試料核酸中の標的配列と塩基配列の相補性を有し、各塩基がこの標的配列と対合を形成しうる領域を意味する。「通常の核酸を構成する塩基」とは、DNA又はRNAを構成するヌクレオチドに含まれる塩基、すなわちDNAにあってはアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン

(C)、チミン(T)の4種類の塩基を、RNAにあってはA、G、C及びウラシル(U)を意味する。「特異的対合を形成する塩基対」とは、AとTもしくはUとの間の塩基対、又はGとCとの間の塩基対を意味する。

【0013】本発明のオリゴヌクレオチドは、特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有する。本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよく、またオリゴリボヌクレオチドであってもよい。

【0014】特異的領域は、試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有する。「実質的に相補的」とは、標的配列に対して完全に相補的であ

る場合の他、少なくとも1塩基のミスマッチを存在する場合を含むことを意味する。特異的領域の長さは、ハイブリダイゼーションにおいてプローブとして機能しうる長さであれば特に制限されるものでないが、通常6~50、好ましくは6~20塩基対程度の長さが適当である。ハイブリダイゼーション領域DNAの塩基配列もまた特に制限されるものでなく、塩基配列の解析対象となるサンプルDNAの塩基配列に応じてその配列を適宜決定することができる。

10 【0015】非特異的領域は、通常の核酸を構成する塩基のそれぞれと塩基対を形成することができる他の塩基を有する少なくとも一つのヌクレオチドまたはそのオリゴマーからなる。上記のような塩基としては、通常核酸を構成する塩基のいずれとも同等に結合するものであることが好ましく、さらに、その結合力が特異的対合を形成する塩基対の結合力よりも弱いことがより好ましい。

20 【0016】このような塩基として具体的には、ヒポキサンチンを例示することができる。また、上記ヌクレオチドとして具体的には、ヒポキサンチンを塩基として有するデオキシリボヌクレオチドであるデオキシイノシンが挙げられる。

【0017】非特異的領域を構成するヌクレオチドまたはそのオリゴマーの数は、特に制限されるものでないが、通常少なくとも一つ、好ましくは2~20、より好ましくは2~8とすることができる。

30 【0018】非特異的領域が特異的領域に連結する位置もまた特に制限がなく、特異的領域の5'末端、3'末端のいずれでもよい。さらに特異的領域の5'末端及び3'末端の両方に非特異的領域が連結されていてもよい。これらの中では後者が好ましい。

【0019】特異的領域の長さとは非特異的領域の長さとの比は、特異的領域の長さやGC含量によっても異なるが、通常、特異的領域の長さが非特異的領域の長さと同じか又はそれ以上であることが好ましい。

40 【0020】本発明のオリゴヌクレオチドの合成法については特に限定されるものではなく、例えば、β-シアノエチルホスホアミダイト法[Nucleic Acids Res. 12 4539 (1984)]、リン酸トリエステル法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 5956 (1984)]、ホスホン酸エステル法[Nucleic Acids Res. 14 5399 (1986)]が挙げられる。特異的領域と非特異的領域との連結は、それぞれ別個に合成した後に行ってもよく、特異的領域を合成した後非特異的領域を1ヌクレオチドずつ順次付加することにより行ってもよい。また、特異的領域と非特異的領域を同時に合成してもよい。

50 【0021】本発明のオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション用のプローブとして利用する場合には、不溶性担体に固定化された形態で使用してもよい。不溶

性担体としては、ニトロセルロース、またはナイロンからなるフィルター、ガラス板、多孔質ガラス、シリカゲル、ラテックスなどが挙げられる。これらの不溶性担体に本発明のオリゴヌクレオチドを固定化する方法は、特に限定されるものではなく、例えば、アミノ修飾したオリゴヌクレオチドを用いる場合には、表面に高密度のカルボキシル基を有するナイロンフィルター上にカルボキシル基を水溶性カルボジイミドによって活性化し、アミド結合させる手法〔J. Org. 262525 (1961)〕や、ピオチン修飾したオリゴヌクレオチドの場合にはアビジンを表面にコーティングした担体にピオチン-アビジン反応で結合させる方法〔Biochemistry 11 2291 (1972)〕、アミノ修飾したオリゴヌクレオチドをトレシル基を導入したシリカゲルに固定化する方法〔Analytical Chemistry Symposium Series 9 203 (1981)〕が挙げられる。また、フィルター上で固定化されたオリゴヌクレオチドを作製する方法として、フォトリソグラフィを応用した手法によって固相上で多種類のDNAを同時に合成する方法〔Science, 251 767 (1991)〕やシールされたガラス板上にDNA合成試薬を接触させることによる合成法〔Nucleic Acids Res. 22 1368 (1994)〕等も使用することができる。

【0022】上記で詳述した本発明のオリゴヌクレオチドは、核酸の塩基配列解析に利用することができる。すなわち本発明の核酸の塩基配列解析法は、上記オリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む。本発明の方法により、ハイブリダイゼーション感度を上昇させることが可能となるとともに、完全に相補的なハイブリッドとミスマッチを有するハイブリッド、特に従来法で区別が困難であった末端ミスマッチが区別し易くなり、それによってハイブリダイゼーション法によるDNA塩基配列解析が容易になる。

【0023】次に、本発明のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションにおいて、ミスマッチが存在する場合のハイブリダイゼーションと、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとを如何にして正確かつ高感度に区別することができるかを説明する。図1は、通常のオリゴヌクレオチドとこのオリゴヌクレオチドにはほぼ相補的であるがミスマッチを含む試料核酸とのハイブリッドを示す模式図である。一般的に、ミスマッチがハイブリッドの中央部に存在する場合にはハイブリダイゼーションに重大な障害となるが、ハイブリッドの末端付近にある場合には、中央部に存在する場合に比べて障害は小さい。

【0024】一方、上記オリゴヌクレオチドと同一の配列の特異的領域を有する本発明のオリゴヌクレオチドと上記試料核酸とのハイブリッドを模式的に図2に示す。図2においてIはイノシンを表す。この図に示されるように、イノシンはいずれのヌクレオチドとも塩基対を形成することができるので、非特異的領域の分だけハイブリッドの長さは延長される。すなわち、通常のオリゴヌクレオチドではハイブリッドの末端に存在していたミスマッチは、本発明のオリゴヌクレオチドではハイブリッドの中央部に位置することとなる。また、ハイブリダイゼーション強度も高くなる。したがって、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとミスマッチを含むハイブリダイゼーションを区別することが容易になる。非特異的領域が特異的領域の5'末端に連結されていれば、特異的領域の5'末端側のミスマッチを検出しやすくなり、非特異的領域が特異的領域の3'末端に連結されていれば、特異的領域の3'末端側のミスマッチを検出しやすくなる。さらに、非特異的領域が特異的領域の5'末端及び3'末端の両方に連結されていれば、特異的領域の5'末端側及び3'末端側のミスマッチの両方を検出することが容易となる。

【0025】本発明のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションの条件は、特に限定されるものではなく、試料核酸の種類や配列、及びオリゴヌクレオチドの配列によって至適な条件は変化し得る。例えば、比較的短鎖のオリゴヌクレオチドを用いた場合は、ハイブリダイゼーション温度を低温にするなど条件を緩く設定することが望ましい。また、DNA塩基配列中にGC残基が多い場合は、AT残基が多い場合に比してハイブリッドの安定性は強まるが、この現象を相殺するためにテトラメチルアンモニウムクロライド等の4級アミンの塩を用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1585 (1985)〕が効果的である。またハイブリダイゼーション溶液中に界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecylsulfate)、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (Sodium N-Lauroylsarcosinate) 等を添加する方法もハイブリダイゼーション感度の向上に効果的である (実施例C参照)。

【0026】核酸の塩基配列の解析をハイブリダイゼーションによって行う場合、試料核酸または本発明のオリゴヌクレオチドのいずれかが標識されていることが好ましい。標識化の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ラジオアイソトープや蛍光色素を用いる手法等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの結果は、各種標識法に即した方法によって測定することができる。

【0027】本発明の塩基配列解析の応用例としては、ハイブリダイゼーション法を用いたDNA塩基配列の決定〔Genomics, 13 1378 (1992)〕

や感染症及び遺伝的疾患の診等、巨大ゲノムDNAのマッピング等に応用可能である。感染症の診断法としては、例えば、被験者の血液等よりDNAを抽出し、そのDNAに対して各種病原体固有の配列から本発明の方法によりDNAプローブを作製し、ハイブリダイゼーション反応を行い、病原体の存在を検出する方法が挙げられる。遺伝的疾患の診断法としては、遺伝病の原因遺伝子に特異的な配列をもとに本発明の方法によりオリゴヌクレオチドを作製し、被験者より得た染色体DNAとのハイブリダイゼーションを行い、その遺伝子中の変異の有無を検出する。巨大ゲノムDNAのマッピングはゲノムDNA解析プロジェクト等には必須の技術であるが、ゲノムバンクに対して本発明の方法で作製した多数のDNAプローブとハイブリダイゼーションを行うことで各クロソムのゲノム上での配置が決定できる〔第16回日本分子生物学会年会 講演要旨集 1334 (1993)〕。DNA塩基配列の決定は、従来、DNAを化学的に分解する方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 560 (1977)〕やDNA合成酵素による方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 5463 (1977)〕が用いられているが、ハイブリダイゼーション法を用いたDNA塩基配列の解析法 (SBH; Sequencing By Hybridization) は、近年注目されている手法である〔Science, 260 1649 (1993)〕。SBH法は、適当なハイブリダイゼーション \*

ン条件を設定することで、目的の長鎖DNAに対して、それと完全に相補的なオリゴDNAプローブのみを選択的にハイブリダイズさせ、特異的にハイブリダイズしたオリゴDNAプローブのデータを集積し解析することで、目的の長鎖DNAの塩基配列を決定する技術である。

【0028】さらに、本発明のオリゴヌクレオチドは、PCR法 (polymerase chain reaction) や塩基配列決定などにおけるポリメラーゼ反応のプライマーとしての利用も期待される。

【0029】

【実施例】実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例により本発明は何等限定されるものではない。

【0030】

【実施例A】ハイブリダイゼーション強度の測定

(A) オリゴヌクレオチドの合成

アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems; ABI社) 製のDNA合成装置 (装置名394 DNA/RNA Synthesizer) によって表1に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、比較対象用オリゴヌクレオチド、及び試料DNAを合成した。尚、以下のオリゴヌクレオチドNo. は配列表の配列番号に相当する。

【0031】

【表1】

表1

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	備 考
(1) (比較例1)	5'-XCCCCTTTT-3'	実施例1用
(2) (比較例2)	5'-XTTCCCCCTT-3'	実施例2用
(3) (比較例3)	5'-XCCTTTTCC-3'	実施例3用
(4) (比較例4)	5'-XCTCTCTCT-3'	実施例4用
(5) (実施例1)	5'-XIIIIICCCCTTT-3'	
(6) (実施例2)	5'-XIIIIITCCCCCTT-3'	
(7) (実施例3)	5'-XIIIIICCTTTTCC-3'	
(8) (実施例4)	5'-XIIIIICTCTCTCT-3'	
(9) (試料DNA)	5'-AGGAAAAGGGGAAGAGAGAGA-3'	オリゴヌクレオチド No. (1)~(8)用
(10) (比較例5)	5'-XCCTTTTCC-3'	実施例5~8用
(11) (実施例5)	5'-XIIIIICCTTTTCC-3'	
(12) (実施例6)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	
(13) (実施例7)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCC-3'	
(14) (実施例8)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCCIIIIIIII-3'	
(15) (試料DNA)	5'-AGAGAGAGAGGAAAAGGAGAGAGAGA-3'	オリゴヌクレオチド No. (10)~(14)用

上記配列中、Xはアミノリンク2、Iはデオキシイノシンを示す。

【0032】上記オリゴヌクレオチド及び試料DNAの合成は標準のプロトコール通りに行い、5'末端の保護 ※50 した。上記(9)の試料DNAをOPCカートリッジ ※基であるトリチル基は除かないサイクルにて合成を終了した。上記(9)の試料DNAをOPCカートリッジ

(ABI社製)を用いて精製を行った。上記(1)～(9)のオリゴヌクレオチド及び試料DNAを濃縮乾固した後、(1)～(8)については0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)に、(9)についてはTE緩衝液に懸濁し、260nmの吸光度測定により定量し、1nmol/ $\mu$ lに調整した。

【0033】(B)オリゴヌクレオチドの固定化  
オリゴヌクレオチドの固定化は、表面に高密度の陰イオン性カルボキシル基を有するナイロン膜にアミノ修飾オリゴヌクレオチドのアミノ基をアミド結合させることにより、以下の通り行った。

【0034】バイオダインC(商標;ボール社製)膜を0.1N HClによりすすぎ、酸性化した後、20% EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルプロピルカルボジミド)塩酸塩)に室温15～30分間浸した。脱イオン水及び0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)で軽くすすいだ後、ドットプロット装置(Bio-Rad社製)にセットした。0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)に懸濁されたアミノ修飾オリゴヌクレオチドを15分間室温で膜と反応させた。TBS(Tris-緩衝食塩水)/0.1% Tween-20によりすすいだ膜を、0.1N NaOHにて10分間処理し、脱イオン水で軽くすすいだ後風乾した。

【0035】(C)試料DNAの標識化  
試料DNAの標識化は[ $\gamma$ -32P] ATPによって、5'末端を放射性ラベルした。反応は、DNA 5'末端標識キット(MEGALABEL TM;宝酒造社製)により \*  
表2

\*り行った。

【0036】(D)ハイブリダイゼーション反応

前記のオリゴヌクレオチド固定化フィルターと、放射性標識した試料DNAとを、5 $\times$  SSC (750mM塩化ナトリウム・75mMクエン酸三ナトリウム)/0.1% (ドデシル硫酸ナトリウム)緩衝液中にて、4～10 $^{\circ}$ C 1時間～一晚ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション反応後、2 $\times$ SSC/0.1% SDS緩衝液にて、4～10 $^{\circ}$ C、5分間の洗浄を3回行った。風乾した後、オートラジオグラフィーにて、各ドットの放射線量を測定し、ハイブリダイゼーション強度を算出した。

【0037】その結果を表2に示す。結果は対照とした比較例のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション強度を1とする相対値で示した。特異的領域の配列が異なる場合にハイブリダイゼーション量も変化するが、イノシン(非特異的領域)の導入によりいずれの場合もハイブリダイゼーション量が増大することが判明した。結合の種類及び数が全く同じ場合では、イノシンを3'、5'両末端に導入した場合の方が5'末端のみにイノシンを導入した場合よりもハイブリダイゼーション量が高いことが判明した。3'、5'両末端にイノシンを導入することで、高感度のハイブリダイゼーションが実現される。

【0038】

【表2】

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	ハイブリダイゼーション強度
(1) (比較例1)	5'-XCCCCTTTT-3'	1.0
(5) (実施例1)	5'-XIIIICCCCTTTT-3'	96
(2) (比較例2)	5'-XTTCCCCTT-3'	1.0
(6) (実施例2)	5'-XIIIIITCCCCTT-3'	29
(3) (比較例3)	5'-XCCTTTTCC-3'	1.0
(7) (実施例3)	5'-XIIIIICCTTTTCC-3'	20
(4) (比較例4)	5'-XCTCTCTCT-3'	1.0
(8) (実施例4)	5'-XIIIIICTCTCTCT-3'	18
(10) (比較例5)	5'-XCCTTTTCC-3'	1.0
(11) (実施例5)	5'-XIIIIICCTTTTCC-3'	20
(12) (実施例6)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	51
(13) (実施例7)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCC-3'	25
(14) (実施例8)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCCIIIIIIII-3'	72

【0039】

【実施例B】ミスマッチの判別

(A)オリゴヌクレオチドの合成

アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems; ABI社)製のDNA合成装置 ※50

※(装置名394 DNA/RNA Synthesiser)によって表3に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、比較対象用オリゴヌクレオチド及び試料DNAを、上記実施例Aの(A)と同様の方法で合成した。



【0040】

【表3】

表3

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	備 考
(16) (対照例1)	5'-XCCTTTTCC-3'	比較例6~8用
(17) (比較例6)	5'-XTCTTTTCC-3'	実施例9, 12, 15, 18用
(18) (比較例7)	5'-XCCTGTTCC-3'	実施例10, 13, 16, 19用
(19) (比較例8)	5'-XCCTTTTCT-3'	実施例11, 14, 17, 20用
(20) (対照例2)	5'-XIIIIICCTTTTCC-3'	実施例9~11用
(21) (実施例9)	5'-XIIIIITCTTTTCC-3'	
(22) (実施例13)	5'-XIIIIICCTGTTCC-3'	
(23) (実施例17)	5'-XIIIIICCTTTTCT-3'	
(24) (対照例3)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	実施例12~14用
(25) (実施例10)	5'-XIIIIITCTTTTCCIIII-3'	
(26) (実施例14)	5'-XIIIIICCTGTTCCIIII-3'	
(27) (実施例18)	5'-XIIIIICCTTTTCTIIII-3'	
(28) (対照例4)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCC-3'	実施例15~17用
(29) (実施例11)	5'-XIIIIIIIIITCTTTTCC-3'	
(30) (実施例15)	5'-XIIIIIIIIICCTGTTCC-3'	
(31) (実施例19)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCT-3'	
(32) (対照例5)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCCIIIIIIII-3'	実施例18~20用
(33) (実施例12)	5'-XIIIIIIIIITCTTTTCCIIIIIIII-3'	
(34) (実施例16)	5'-XIIIIIIIIICCTGTTCCIIIIIIII-3'	
(35) (実施例20)	5'-XIIIIIIIIICCTTTTCTIIIIIIII-3'	オリゴヌクレオチド No. 16~35用
(15) (試料DNA例)	5'-AGAGAGAGAGAAAAGGAGAGAGAGA-3'	

Xはアミノリンク2、Iはイノシンである。

【0041】 (B) オリゴヌクレオチドの固定化

実施例Aの(B)と同様に行行った。

(C) 試料DNAの標識化

実施例Aの(C)と同様に行行った。

(D) ハイブリダイゼーション反応

実施例Aの(D)と同様に行行った。

(E) ミスマッチ判別能の計算

\* ハイブリダイゼーション反応によって得られた結果よ

30 り、ミスマッチ判別能を算出した。ミスマッチ判別能とは、下記のD値(Discrimination value)を指標とする概念であり、ミスマッチの区別し易さをさす。

【0042】

【数1】

\*

試料DNAと完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション量

D値=

ミスマッチを有する配列のハイブリダイゼーション量

【0043】 試料DNAと完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション量とは、対照例の配列のハイブリダイゼーション量を指し、ミスマッチを有する配列のハイブリダイゼーション量とは、その対照例に対応する比較例あるいは実施例の配列のハイブリダイゼーション量を指す。D値は、対照例の配列に対する比較例あるいは実施例の配列のハイブリダイゼーション量の比である。即ち、対照例の配列のD値は1であり、比較例及び実施例に関してはD値が高ければその配列が対照例の配列と区別し易い(ハイブリダイゼーション量が対照例に対して ※

※小さい)ことを表す。

40 【0044】 表4に各配列のD値を示す。イノシンを導入したオリゴヌクレオチドの方がD値が高く、特に3', 5'両末端にイノシンを導入したオリゴヌクレオチドの方がD値が高い。ミスマッチの判別能は、イノシンを導入したオリゴヌクレオチド、特に3', 5'両末端にイノシンを導入したオリゴヌクレオチドが優れていることが判明した。

【0045】

【表4】

表4 定量結果・ミスマッチ判別能(D値)

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	D値
(17) (比較例6)	5'-XTCTTTTCC-3'	3~5
(21) (実施例9)	5'-XIIIIITCTTTTCC-3'	26
(25) (実施例10)	5'-XIIIIITCTTTTCCIIII-3'	40
(29) (実施例11)	5'-XIIIIIIITCTTTTCC-3'	17
(33) (実施例12)	5'-XIIIIIIITCTTTTCCIIIIII-3'	31
(18) (比較例7)	5'-XCCTGTTCC-3'	4~5
(22) (実施例13)	5'-XIIIIICCTGTTCC-3'	>1000
(26) (実施例14)	5'-XIIIIICCTGTTCCIIII-3'	98
(30) (実施例15)	5'-XIIIIIIICCTGTTCC-3'	>1000
(34) (実施例16)	5'-XIIIIIIICCTGTTCCIIIIII-3'	560
(19) (比較例8)	5'-XCCTTTTCT-3'	3~5
(23) (実施例17)	5'-XIIIIICCTTTTCT-3'	14
(27) (実施例18)	5'-XIIIIICCTTTTCTIIII-3'	26
(31) (実施例19)	5'-XIIIIIIICCTTTTCT-3'	7
(35) (実施例20)	5'-XIIIIIIICCTTTTCTIIIIII-3'	24

## 【0046】

【実施例C】界面活性剤のハイブリダイゼーション反応への影響

## (A) DNAの合成

アプライド・バイオシステムズ社 (Applied Biosystems; ABI社) 製のDNA合成装置  
(装置名394 DNA/RNA Synthesis \*

\*er) によって表5に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、比較対称用オリゴヌクレオチド及び試料DNAを、上記実施例Aの(A)と同様の方法で合成した。

## 【0047】

## 【表5】

表5

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	備考
(16)	5'-XCCTTTTCC-3'	対照例1、実施例1用
(24)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	対照例2、実施例2用
(15)	5'-AGAGAGAGAGAAAAGGAGAGAGAGA-3'	試料DNA用

Xはアミノリンク2、Iはイノシンである。

## 【0048】(B) DNAの固定化

実施例Aの(B)と同様に行行った。

## (C) DNAの標識化

実施例Aの(C)と同様に行行った。

## (D) ハイブリダイゼーション反応

前記のオリゴヌクレオチド固定化フィルターに対して、放射性標識した試料DNAを、5×SSC(750mM塩化ナトリウム・75mMクエン酸三ナトリウム)／7% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム緩衝液中にて、4~10℃1時間〜晩ハイブリダイゼーション反応させた。ハイブリダイゼーション反応後、2×SSC／0.1% SDS緩衝液中にて、4~10℃、5分間の洗浄を3回行った。また、対照実験として、同様に作製したオリゴヌクレオチド固定化フィルターに対して、5×SSC(750mM塩化ナトリウム・75mMクエン酸三ナトリウム)緩衝液中にて、4~10℃ 1時 ※50

※間〜晩ハイブリダイゼーション反応させた。ハイブリダイゼーション反応後、2×SSC緩衝液中にて、4~10℃・5分間の洗浄を3回行った。風乾した後、オートラジオグラフィーにて、各ドットの放射線量を測定し、ハイブリダイゼーション強度を算出した。

【0049】その結果を表6に示す。結果は、界面活性剤(N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム)を用いた場合の背景の放射線量を1とする相対値で示した。ハイブリダイゼーション反応にN-ラウロイルサルコシン酸ナトリウムを添加させるとフィルターへの非特異的な吸着によるバックグラウンドのシグナルを低下させる効果とともに、ハイブリダイゼーション強度が増大し、結果としてハイブリダイゼーション感度の向上が認められた。

## 【0050】

## 【表6】

表6

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	界面活性剤	放射線量 (相対値)
(16) (対照例1)	5'-XCCTTTTCC-3'	無添加	1. 5
(16) (実施例1)	5'-XCCTTTTCC-3'	添加	2. 2
(24) (対照例2)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	無添加	1. 8
(24) (実施例2)	5'-XIIIIICCTTTTCCIIII-3'	添加	3. 0
バックグラウンド1 (対照例1, 2用)		無添加	1. 6
バックグラウンド2 (実施例1, 2用)		添加	1. 0

## 【0051】

【発明の効果】本発明によれば、ハイブリダイゼーション感度を上昇させることが可能となるとともに、完全に相補的なハイブリッドとミスマッチを有するハイブリッド、特にハイブリッドの末端部でのミスマッチが区別し易くなり、それによってハイブリダイゼーション法によるDNA塩基配列解析が容易になる。

## 【0052】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

CCCCCTTT 8

## 【0053】配列番号: 2

配列の長さ: 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

TTCCCTTT 8

## 【0054】配列番号: 3

配列の長さ: 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

CCTTTTCC 8

## 【0055】配列番号: 4

配列の長さ: 8

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

\* 配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列

CTCTCTCT 8

## 【0056】配列番号: 5

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

20 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列

IIIIICCCCTT TT 12

## 【0057】配列番号: 6

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

30 配列

IIIIITCCCC TT 12

## 【0058】配列番号: 7

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTTTT CC 12

40 【0059】配列番号: 8

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIICTCTCT CT 12

## 【0060】配列番号: 9

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

\* 50

鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
AGGAAAAGGG GAAGAGAGAG A 21  
【0061】配列番号：10  
配列の長さ：8  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
CCTTTTCC 8  
【0062】配列番号：11  
配列の長さ：12  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
IIIIICCTTTT CC 12  
【0063】配列番号：12  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
IIIIICCTTTT CCIIII 16  
【0064】配列番号：13  
配列の長さ：16  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
IIIIIIHICC TTTTCC 16  
【0065】配列番号：14  
配列の長さ：24  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
IIIIIIHICC TTTTCCIIII IIII 24  
【0066】配列番号：15  
配列の長さ：26  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
AGAGAGAGAG GAAAAGGAGA GAGAGA 26  
【0067】配列番号：16  
配列の長さ：8  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
10 配列  
CCTTTTCC 8  
【0068】配列番号：17  
配列の長さ：8  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
TCTTTTCC 8  
20 【0069】配列番号：18  
配列の長さ：8  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
CCTGTTCC 8  
【0070】配列番号：19  
配列の長さ：8  
30 配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
CCTTTTCT 8  
【0071】配列番号：20  
配列の長さ：12  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
40 トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
配列  
IIIIICCTTTT CC 12  
【0072】配列番号：21  
配列の長さ：12  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド  
50 配列

IIIIITCTTTT CC 12

【0073】配列番号：22

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTGTT CC 12

【0074】配列番号：23

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTTTT CT 12

【0075】配列番号：24

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTTTT CCIIII 16

【0076】配列番号：25

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIITCTTTT CCIIII 16

【0077】配列番号：26

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTGTT CCIIII 16

【0078】配列番号：27

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIICCTTTT CTIIII 16

【0079】配列番号：28

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIICC TTTTCC 16

【0080】配列番号：29

配列の長さ：16

10 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIITC TTTTCC 16

【0081】配列番号：30

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIICC TGTTC 16

【0082】配列番号：31

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

30 配列

IIIIIIICC TTTTCT 16

【0083】配列番号：32

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIICC TTTTCCIIII IIII 24

40 【0084】配列番号：33

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIITC TTTTCCIIII IIII 24

【0085】配列番号：34

配列の長さ：24

50 配列の型：核酸

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIICC TGTTCIIII IIII 24

【0086】配列番号：35

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

【図1】

```

      A GCTCAGTACTGCATGAT
      : |||||
...AGCTAGCT C GAGTCATGACGTACTA...

```

22

\* トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

IIIIIIICC TTTCTIIII IIII 24

【図面の簡単な説明】

【図1】 通常のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリッドを示す模式図。

【図2】 本発明のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリッドを示す模式図。

\*

10

【図2】

```

      IIIIIII A GCTCAGTACTGCATGAT
      : |||||
...AGCTAGCT C GAGTCATGACGTACTA...

```

フロントページの続き

(72)発明者 湯川 英明

茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号

三菱化学株式会社筑波研究所内

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08070900 A**

(43) Date of publication of application: **19.03.96**

(51) Int. Cl.

**C12Q 1/68**  
**C12N 15/09**

(21) Application number: **07024410**

(22) Date of filing: **13.02.95**

(30) Priority: **22.02.94 JP 06 24168**  
**29.06.94 JP 06147291**

(71) Applicant: **MITSUBISHI CHEM CORP**

(72) Inventor: **FUGONO NOBUTAKE**  
**KURUSU YASUROU**  
**TERASAWA MASATO**  
**YUGAWA HIDEAKI**

**(54) ANALYSIS OF BASE SEQUENCE OF  
OLIGONUCLEOTIDE AND NUCLEIC ACID**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To provide a new oligonucleotide having a specific region complementary to a target sequence in a specimen nucleic acid and a non-specific region connected to at least one of both terminals of the specific region and useful e.g. for the determination of the base sequence of a nucleic acid and the diagnosis of infectious diseases and genetic diseases.

**CONSTITUTION:** This oligonucleotide contains a specific region and one or two non-specific regions connected to at least one of both terminals of the specific region. The specific region has a specific base sequence complementary to the target sequence in the specimen nucleic acid active to hybridize the oligonucleotide and the non-specific region is composed of at least one nucleotide or its oligomer having the other base capable of forming base pairs for each of the bases constituting a conventional nucleic acid. This new oligonucleotide is suitable as a hybridization probe for the determination of the base sequence of a nucleic acid, the diagnosis of infectious diseases and genetic diseases and the base sequence analysis, etc., of nucleic acid such as genom mapping.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

<sup>A</sup>GCTCAGTACTGCATCAT  
                  :|||||  
...AGGTAGGTC<sub>C</sub>GAGTCATGACGTACTA...